

THESIS

MUNICH

1967

ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER  
17 $\beta$ -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE AUS DEM  
MYOMETRIUM VON KANINCHEN

LANE MEDICAL LIBRARY  
STANFORD UNIVERSITY  
MEDICAL CENTER  
STANFORD, CALIF. 94305

Klaus-Jürgen Thun







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

AUS DER 1.FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE  
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Bickenbach

---

ANREICHERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER  
7 $\beta$ -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE AUS DEM  
MYOMETRIUM VON KANINCHEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus - Jürgen Thun

aus Coburg

München 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bickenbach

Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 10. 1967

Druck: H. M. Hessel, 8 München 80, Pariser Str. 44

## MEINEN ELTERN

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                    | Seite |
|--------------------------------------------------------------------|-------|
| Einleitung                                                         | 1     |
| Material und Methoden                                              | 4     |
| Ergebnisse                                                         | 9     |
| Bestimmung der Homogenisierungsdauer                               | 9     |
| Bestimmung der Zentrifugierbeschleunigung                          | 10    |
| Hitzeschritt                                                       | 10    |
| Fraktionierte 2. Ammonsulfatfällung                                | 11    |
| Sephadex Gelfiltration                                             | 11    |
| Anreicherung des Enzyms                                            | 13    |
| Abhängigkeit des Substratumsatzes<br>von Puffer und pH-Wert        | 14    |
| Abhängigkeit des Substratumsatzes<br>von der Substratkonzentration | 16    |
| Substratspezifität des Enzyms                                      | 18    |
| Cofaktoren                                                         | 19    |
| Nachweis von SH-Gruppen                                            | 20    |
| Bestimmung der Molekülgröße                                        | 21    |
| Diskussion der Versuchsergebnisse                                  | 24    |
| Zusammenfassung                                                    | 31    |
| Literatur                                                          | 33    |
| Lebenslauf                                                         | 43    |

## EINLEITUNG

Steroiddehydrogenasen gehören zur Gruppe der Oxydoreduktasen. Sie katalysieren die Umwandlung von Steroidalkoholen in Steroidketone. Die reagierende Hydroxy- bzw. Oxogruppe des Steroidmoleküls wird bei der Kennzeichnung des Enzyms als Präfix vorangestellt, z.B. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Steroiddehydrogenasen wurden bisher in einer Vielzahl von Organismen und Organen nachgewiesen. So konnte TALALAY 1952 eine 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus einer mit Testosteron beimpften Kultur von *Pseudomonas testosteroni* (68) nachweisen und ihre Eigenschaften aufzeigen (13,49,50,51,70). Von der 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase wurde eine 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase abgetrennt (20,34,35,51,66,70).

Im Jahre 1953 entdeckte SCHNEIDER in der Säugetierleber eine 21-Dehydrogenase, die die Aldehydgruppe an C<sub>21</sub> von 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihydroxy-21-oxopregn, 4-en-3,20-dion zum entsprechenden Alkohol reduzierte (65).

In den folgenden Jahren fand man, daß die  $\Delta$ 4- und  $\Delta$ 5-Steroid-Isomerasen aus *Pseudomonas testosteroni* (63,71) auch als Dehydrogenasen wirken: die  $\Delta$ 5,3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3,49,62,63,71,75), die  $\Delta$ 4,3 $\alpha$ - und  $\Delta$ 4,3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (76).

Weiter konnten die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Ratten- und Mäuseleber von DOUNCE u.a. (12,19) identifiziert werden und die 17 $\beta$ -Östradiol-Dehydrogenase

---

Die Zahlen in Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis Seite

aus menschlicher Plazenta von LANGER und ENGEL (47,48). Dieses Enzym ist wahrscheinlich mit der später von JARABAK, ADAMS, WILLIAMS-ASHMAN und TALALAY beschriebenen 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase identisch (37).

Die von HÜBENER u.a. aus *Streptomyces hydrogenans* sowie aus der Rattenleber isolierten und kristallisierten 20 $\alpha$ - und 20 $\beta$ -Steroid-Dehydrogenasen (15,16,24,32,56,57,64,73,74) haben für die Bestimmung der 20-Ketosteroide und die Progesteronbestimmung nach ZANDER und HENNING praktische Bedeutung erlangt (5).

Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die TALALAY et al.(37) aus menschlicher Plazenta etwa 2500 fach anreichern konnte, erlangte besonderes Interesse. Das Enzym soll nach Ansicht TALALAY's eine Schlüsselfunktion beim Wirkungsmechanismus der Östrogene haben. Jedoch ist diese Hypothese nicht unwidersprochen geblieben (46,80,81).

17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen wurden in den letzten Jahren in einer Reihe von Warm- und Kaltblüterorganen mit biochemischen und histochemischen Methoden nachgewiesen. So isolierte BREUER eine 17 $\beta$ -Östradiol: NAD - Oxydoreduktase aus dem Lebercytoplasma von Fischen und Amphibien (9,10). Im Säugetierorganismus gelang der Nachweis in den Erfolgsorganen der männlichen und weiblichen Sexualhormone wie in Prostata und Samenblasen von Ratten und Meerschweinchen durch KINSON und KOCHAKIAN (42), in menschlichem Endometrium durch VILLEE et al.(29) und im experimentellen Mammatumor durch BREUER et al., HOLLANDER et al.(11,30).

Ferner wurde gezeigt, daß die Hypophyse (77), Leber (20,45), Niere (8,44) und Nebenniere (14) von Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen eine 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase enthalten. In den Erythrozyten war

ebenfalls eine 17 $\beta$ -Östradiol-Dehydrogenase beim Menschen und bei 14 Tierarten nachweisbar (7,60).

Im Myometrium konnte JÜTTING eine Östradiol - spezifische 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase nachweisen. Die Aktivität des Enzyms war dabei abhängig vom Funktionszustand des Organs. So zeigte sich im Laufe der Schwangerschaft ein Anstieg der Spezifischen Aktivität auf das 25fache des Normalwerts (39). Ein Anstieg auf das 50fache des Ausgangswertes konnte nach parenteraler Östrogenzufuhr erreicht werden (40).

Es war Aufgabe dieser Arbeit, die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid: NAD-Oxydoreduktase (17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) aus dem Myometrium des Kaninchens anzureichern und ihre Eigenschaften zu studieren.

## MATERIAL UND METHODEN

### REAGENTIEN UND LÖSUNGEN

Alle Reagentien waren - soweit nicht anders angegeben - vom Reinheitsgrad "pro analysi" (Fa. E. Merck AG). Thio-glykol reinst (Fa. Th. Schuchardt) wurde vor Verwendung im Vakuum destilliert.

Tris- (Hydroxymethyl-aminomethan), Nicotinsäureamid-adenindinucleotid-phosphat (NADP), Nicotinsäureamid-adenindinucleotid (NAD) und reduziertes Nicotinsäure-amid-adenindinucleotid (NADH) wurden von Fa. Boehringer und Söhne, Azetylpyridin-NAD und Testosteron von Mann Research Laboratories, Östron und  $17\beta$ -Östradiol von Sigma Chem. Comp., Östron- $4C^{14}$  und  $17\beta$ -Östradiol- $16C^{14}$  von The Radiochemical Centre, Testosteron- $4C^{14}$  von New England Nuclear Corp. und p-Chlormercuri-benzoesäure sowie o-Jodoso-benzoesäure von Fa. Fluka geliefert. Die Dextrangele Sephadex G50, G 75 und G 100 wurden von Fa. Pharmacia bezogen.

Die Aufarbeitung des Materials erfolgte unter Verwendung der von JARABAK, ADAMS, WILLIAMS-ASHMAN und TALALAY (37) angegebenen, glyzerinhaltigen, wäs-srigen Lösungen:

|          | Kaliumphosphat | EDTA    | Thioglykol | Glyzerin |   |
|----------|----------------|---------|------------|----------|---|
| Medium A | 0,01 m         | 0,005 m | 0,007 m    | 20%      | 7 |
| Medium B | 0,01 m         | 0,005 m | 0,007 m    | 50%      | 7 |
| Medium C | 0,005 m        | 0,001 m | 0,007 m    | 20%      | 7 |

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 0 -  $4^{\circ}C$  durchgeführt.

## VERSUCHSTIERE

Weibliche Kaninchen wurden, unmittelbar nachdem sie geworfen hatten, durch Genickschlag getötet und die beiden Uterushörner sofort entnommen.

## GEWEBE AUFBEREITUNG

Das Myometrium wurde sorgfältig von Fett und Bindegewebe sowie von Plazentaresten und anhaftender Dezidua befreit und 2x je 5 sec (Ultra Turrax Typ 18/2) mit der 3fachen Menge Medium A homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden vom löslichen Protein durch Zentrifugieren (30 Min. 11000 x g; T=0°C) abgetrennt.

### 1. AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Der Überstand des Homogenates wurde langsam mit festem Ammoniumsulfat unter ständigem Rühren bis zu einer Sättigung von 60% gebracht, wobei mit  $\text{NH}_4\text{OH}$  etwa pH 7 eingehalten wurde. Nach 60 Min. Rühren wurde zentrifugiert (30 Min. 11000 x g; T=0°C). Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag in etwa 10 ml Medium B aufgenommen: Fraktion AS I. Die von 6 Tieren erhaltenen Fraktionen AS I wurden vereinigt und gemeinsam weiterverarbeitet.

## DIALYSE

Je 30 ml Proteinlösung AS I wurden durch 3x je 12 - 20 Stunden Dialyse gegen je 2,3 l Medium C von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  befreit. Die Entsalzung wurde durch Leitfähigkeitsmessung kontrolliert. Anfangswert 5 x 15 mS, Endwert 4 x 5  $\mu\text{S}$  (das entspricht der Leitfähigkeit von Medium C).

## 2. AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Die dialysierte Eiweißlösung AS I wurde unter ständigem Rühren mit kaltgesättigter Ammoniumsulfatlösung auf 25% Sättigung gebracht. Nach 60 Min. Rühren wurde 30 Min. bei 11000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen. Der Überstand wurde mit gesättigter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung bis 47% Sättigung mit Ammoniumsulfat gebracht, wie oben zentrifugiert und der dabei abgesetzte Niederschlag in Medium C gelöst: Fraktion AS II. Der Überstand wurde verworfen.

### 1. GELFILTRATION AN SEPHADEX G 100

Das trockene Dextrangel wurde 3 Tage lang mit einem Überschuß Wasser versetzt, mehrfach aufgerührt und der trübe Überstand nach Sedimentation des Gels jeweils dekantiert. Das fertig gequollene Gel wurde mehrmals mit einem Überschuß Medium C versetzt und kräftig gerührt. Nach Einfüllen des so behandelten Gels in eine Säule von 2,5 cm  $\emptyset$  und 45 cm Höhe (18" Sephadex Chromatographierohr, Vol = 205 ml,  $V_0$  = 60 ml) wurde solange mit Medium C nachgewaschen, bis die Extinktion bei 260 und 280 m $\mu$  im Eluat gleich der von Medium C war.

Wenn nicht anders angegeben, wurden bei Raumtemperatur ( $T=20^\circ$ ) jeweils 5 - 15 ml Proteinelösung AS II mit einem Proteingehalt von 6 - 9 mg/ml auf die Säule gegeben. Nach dem Einsinken der Eiweißlösung wurde mit Medium C eluiert. Das Eluat wurde in 6 ml - Fraktionen aufgefangen. Die Bestimmung der Extinktion 254 m $\mu$  erfolgte mit Hilfe des Uvicord 4701 A (LKB Produkter).

## 2. GELFILTRATION AN SEPHADEX G 100

Die enzymatisch aktiven Fraktionen aus der 1. Gelfiltration wurden vereinigt und nach Konzentrieren einer erneuten Gelfiltration an Sephadex G 100 unterworfen. Das Konzentrieren der Proteinlösungen erfolgte entweder durch Versetzen mit gesättigter Ammonsulfatlösung bis zu einer Sättigung von 60%, anschließend Zentrifugieren ( $11000 \times g$ ) und Auflösen des Niederschlags in Medium C oder mit Hilfe eines Ultrafilters (6300 A, LKB Produkter).

## BESTIMMUNG DES EIWEISSGEHALTES

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Lösungen erfolgte entweder mit Hilfe der Biuret-Methode (3) oder bei geringeren Proteinkonzentrationen mittels UV-Messung nach KALCKAR (24) (Zeiss PMQ 2).

## MESSUNG DER ENZYMAKTIVITÄT

Die Messung der Aktivität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase erfolgte

- A) durch Bestimmung des während der enzymatischen Inkubation umgesetzten Substrates (Östron) oder
- B) durch Bestimmung des während der enzymatischen Inkubation hydrierten Cofaktors (NAD) im optischen Test auf NADH nach O. WARBURG.

- A) Folgende Reagentien wurden in wässriger Lösung mit 0,2 - 0,5 ml Enzym inkubiert: 300  $\mu$ M Tris/HCl, 1,0  $\mu$ M NAD, 0,27  $\mu$ M 17 $\beta$ -Östradiol, 0,03  $\mu$ M 17 $\beta$ -Östradiol-16C<sup>14</sup> in 0,1 ml Äthanol. pH = 9,5, Gesamtvolumen 3,0 ml, T = 25°C.

Die enzymatische Reaktion wurde durch 5 malige Extraktion der Ansätze mit je 3 ml Äther/Chloroform (3 : 1) beendet. Die vereinigten Extrakte eines jeden

Ansatzes wurden unter vermindertem Druck im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht und in 0,5 ml Äthanol aufgenommen. 0,2 ml der äthanolischen Steroidlösung wurden auf 3 cm breite Papierstreifen aufgetragen (Chromatographiepapier 2043 Mgl, Schleicher & Schüll). Danach wurden die Streifen mit 20% Formamid in Methanol imprägniert und für 2 1/2 Std. absteigend im System Benzol/Chloroform (4 : 1, mit Formamid gesättigt) chromatographiert. Die Radioaktivität der C<sup>14</sup>-Steroide wurde mit Hilfe eines fensterlosen Methandurchflußzählers (Friesseke & Höpfner, Typ FH 49) gemessen und von einem Schreiber registriert. Die Flächen der einzelnen Peaks (Östradiol-C<sup>14</sup>, Östron - C<sup>14</sup>) wurden planimetrisch bestimmt und aus dem Verhältnis dieser Flächen zueinander der Umsatz von Östradiol zu Östron berechnet.

B) Die Bestimmung der Enzymaktivität mit Hilfe des optischen Tests erfolgte in folgendem Ansatz in wässriger Lösung:

300  $\mu$ M Tris/HCl pH 9,5, 20 mg Serumalbumin (Fa. Behring) 1,0  $\mu$ M NAD, 0,3  $\mu$ M 17 $\beta$ -Östradiol in 0,1ml Äthanol und einem aliquot Enzym. Gesamtvol. = 3,0 ml, T=25°, d= 1 cm. Bestimmung der Extinktionsänderung bei 366 m $\mu$  im Photometer Eppendorf.

## DEFINITION DER ENZYMAKTIVITÄT

Als eine Enzymeinheit wurde diejenige Menge Enzym definiert, die 1  $\mu$ M Östradiol in 60 Min. in Östron umwandelt.

$$1 \text{ Enzymeinheit} = \frac{1 \text{ } \mu\text{M Östron}}{h}$$

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\mu\text{M Östron}}{h \times \text{mg Protein}}$$

# ERGEBNISSE

## BESTIMMUNG DER GÜNSTIGSTEN HOMOGENISIER- DAUER

In Vorversuchen wurde die günstigste Homogenisierdauer bestimmt. Es zeigte sich nach Tabelle I bei zunehmender Dauer des Homogenisierens ein starker Temperaturanstieg. Die Ausbeute an löslichem Protein blieb auch bei kurzen Homogenisierzeiten gut. Es wurde deshalb zweimal je 5 sec. unter Kühlung im Eiswasserbad homogenisiert.

| Homogenisier-<br>dauer (sec) | T<br>ohne Kühlg.<br>(°C) | T<br>mit Kühlg.<br>(°C) | Gesamtmenge<br>Protein im<br>Überstand (mg) |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|
| Plazenta:                    |                          |                         |                                             |
| 5                            | + 10,7                   | + 8,0                   | 22,7                                        |
| 10                           | + 11,6                   | + 9,9                   | 23,7                                        |
| 15                           | + 14,4                   | + 11,9                  | 26,4                                        |
| 20                           | + 17,5                   | + 13,5                  | 25,8                                        |
| Muskel:                      |                          |                         |                                             |
| 5                            |                          | + 5,0                   | 23,4                                        |
| 10                           |                          | + 5,5                   | 26,6                                        |
| 15                           |                          | + 7,6                   | 23,6                                        |
| 20                           |                          | + 11,3                  | 21,2                                        |

Tabelle I. Abhängigkeit der Temperatur von der Dauer des Homogenisierens. Je 1 g Skelettmuskulatur vom Meerschweinchen bzw. menschlicher Plazenta und 5ml Med.A wurden mit und ohne Kühlung im Eiswasserbad homogenisiert und die Erwärmung gemessen. Nach dem Zentrifugieren bei 11000 x g wurden Menge und Proteingehalt des Überstandes bestimmt (Biuret-Methode).

## BESTIMMUNG DER GÜNSTIGSTEN ZENTRIFUGIER-BESCHLEUNIGUNG

Zur Bestimmung der optimalen Zentrifugierbeschleunigung wurde in Vorversuchen Plazenta-Homogenat (5g Plazenta und 30 ml Medium A, 2 x 5 sec Ultra Turrax) bei 1000 x g, 10000 x g usw. zentrifugiert. Es zeigte sich, daß auch bei höheren g-Zahlen der Proteingehalt im Überstand etwa konstant blieb.

Tabelle II zeigt die Proteinmenge und die Gesamtaktivität von Homogenat des Kaninchenmyometriums, das fraktioniert zentrifugiert wurde. Die Gesamtaktivität im Überstand blieb oberhalb 11000 x g annähernd konstant. Es wurde deshalb bei den weiteren Versuchen 30 Min. mit 11000 x g zentrifugiert.

| Zentrifugier-<br>beschleuni-<br>gung | Überstands-<br>volumen<br>(ml) | Protein-<br>gehalt<br>(mg/ml) | Spez. Akt. $\left(\frac{\mu\text{M Östron}}{\text{h} \times \text{mg Prot.}}\right)$ | Gesamtakt. $\left(\frac{\mu\text{M Östron}}{\text{h}}\right)$ |
|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1000 x g                             | 5,0                            | 15,1                          | 33,4                                                                                 | 2510                                                          |
| 11000 x g                            | 5,2                            | 14,8                          | 44,2                                                                                 | 3410                                                          |
| 54000 x g                            | 5,3                            | 14,4                          | 45,8                                                                                 | 3560                                                          |
| 105000 x g                           | 5,5                            | 14,3                          | 51,4                                                                                 | 4050                                                          |

Tabelle II. Aktivität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Kaninchenmyometrium in Abhängigkeit von der g-Zahl. 13,8 g Kaninchenmyometrium wurden mit 40 ml Medium A homogenisiert. Je 8 ml Homogenat wurden bei verschiedenen g-Zahlen je 30 Min. zentrifugiert.

## HITZESCHRITT

Versuche, durch Hitzedenaturierung eine Anreicherung der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu erreichen, verliefen ohne befriedigendes Ergebnis. Bei Erhöhung der Temperatur auf 45°, 50° und 55°C und anschließendem

Zentrifugieren fand sich jeweils sowohl im Überstand als auch im Niederschlag Enzymaktivität. Eine Erhöhung der Spezifischen Aktivität konnte nicht erreicht werden.

## FRAKTIONIERTE 2. AMMONIUMSULFATFÄLLUNG

Bei schrittweiser Erhöhung der Ammonsulfatkonzentration in dialysiertem Protein AS I aus Kaninchenmyometrium (siehe oben) wurde die Hauptmenge des enzymatisch aktiven Proteins etwa zwischen 25% und 47% Sättigung präzipitiert. Siehe Tabelle III und Abbildung 1.

| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -<br>Sättigung | Proteingehalt<br>(mg/ml) | Spezif. Aktivität<br>$\left(\frac{\mu\text{M Östron}}{\text{h} \times \text{mg}}\right)$ |
|---------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                           | 7,8                      | 111,0                                                                                    |
| 0 - 24%                                     | 5,7                      | 100,0                                                                                    |
| 0 - 28%                                     | 4,9                      | 92,5                                                                                     |
| 0 - 32%                                     | 4,7                      | 64,5                                                                                     |
| 0 - 38%                                     | 3,7                      | 39,5                                                                                     |
| 0 - 43%                                     | 2,9                      | 22,6                                                                                     |
| 0 - 46%                                     | 2,6                      | 20,4                                                                                     |
| 0 - 47%                                     | 2,4                      | 20,0                                                                                     |
| 0 - 50%                                     | 1,8                      | 18,5                                                                                     |

Tabelle III. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung. Je 3 ml dialysierte Proteinlösung AS I wurden mit entsprechenden Mengen kaltgesättigter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 7,0) unter Rühren versetzt und 30 Min. weitergerührt. Nach dem Abzentrifugieren (30 Min. 10000 x g) Bestimmung der Spezifischen Aktivität im Überstand. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

## SEPHADEX GELFILTRATION

Durch Gelfiltration an Sephadex G 100 konnte das Enzymprotein von der Hauptmenge des enzymatisch inaktiven Pro-

teins, welches mit  $V_0$  eluiert wurde, getrennt werden (siehe Abb.2). Versuche mit Sephadex G 50 und Sephadex G 75 ergaben weniger günstige Resultate (siehe Abb. 8 Seite 22).

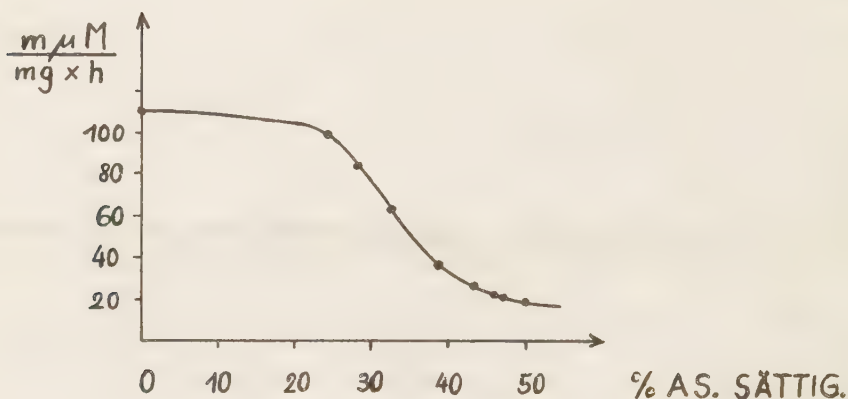


Abb.1. Abhängigkeit der Spezifischen Aktivität der  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase im Überstand  $11000 \times g$  von der Ammonsulfatkonzentration. Methodische Einzelheiten siehe Tabelle III.

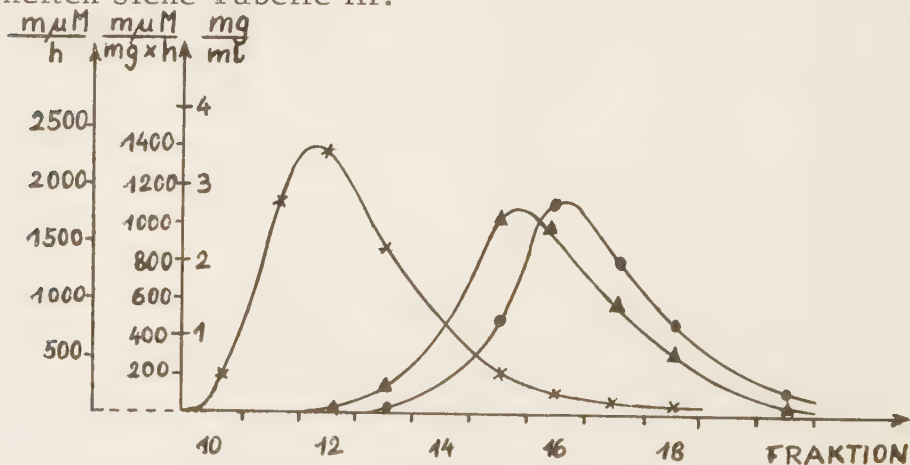


Abb.2. Gelfiltration mit Sephadex G 100. Eine 45 cm lange Säule von 2,5 cm  $\phi$  mit dem Dextrangel (s. Methodik) wurde mit 10 ml Proteinlösung AS II (Proteingehalt 6,9 mg/ml, Spez. Akt. 166) beladen und mit Medium C eluiert. Auffangen von 6 ml-Fractionen. Proteingehalt, Gesamtaktivität und Spezifische Aktivität wurden registriert.

# ANREICHERUNG DER 17 $\beta$ -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE AUS KANINCHENMYOMETRIUM

Kaninchenmyometrium wurde 2x je 5 sec mit der dreifachen Menge Medium A homogenisiert. Anschließend wurde 2 x mit Ammoniumsulfat fraktioniert: die erste Fällung zwischen 0 und 60% Sättigung (AS I) und nach Dialyse die zweite Fällung zwischen 25 und 47% Sättigung (AS II). Das Protein AS II wurde zweimal einer Gelfiltration an Sephadex G 100 unterworfen und auf eine Spezifische Aktivität von 5400 gebracht. In Tabelle IV ist die auf dem angegebenen Wege erzielte 94 fache Anreicherung zusammengefaßt.

Alle weiteren Untersuchungen wurden - soweit nicht anders vermerkt - mit dem gereinigten Enzymprotein durchgeführt.

| Enzympräparation                 | Gesamtprotein (mg) | Gesamtakt. ( $\frac{\mu\text{M Östron}}{\text{h}}$ ) | Spez. Akt. ( $\frac{\mu\text{M Öst.}}{\text{h} \times \text{mg}}$ ) | Ausbeute (%) | Anreicherung |
|----------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|
| Homogenat-überstand 11000 x g    | 1260               | 76200                                                | 60,8                                                                | (100)        | -            |
| 1. Ammonsulf. Fällg. und Dialyse | 680                | 59600                                                | 88                                                                  | 78           | 1,45         |
| 2. Ammonsulfat-Fällg.            | 182                | 29100                                                | 160                                                                 | 38           | 2,65         |
| 1. Sephadex Gelfiltr.            | 30,4               | 23600                                                | 781                                                                 | 31           | 13,8         |
| 2. Sephadex Gelfiltr.            | 4,14               | 22200                                                | 5365                                                                | 29           | 94,0         |

Tabelle IV. Reinigung der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Kaninchenmyometrium am Ende der Tragzeit.

# ABHÄNGIGKEIT DES STEROIDUMSATZES VOM VERWENDETEN PUFFERSYSTEM UND VON DER H-IONEN-KONZENTRATION

Mit verschiedenen Puffern wurde die Abhängigkeit des Substratumsatzes von der H-Ionen-Konzentration des Inkubationsansatzes bestimmt. Es zeigte sich - wie in Abb.3 zusammengestellt - daß das Optimum der enzymatischen Oxydation von Östradiol zu Östron etwa bei pH 9,4 lag. Bei Erhöhung des pH-Werts nahm die Spezifische Aktivität des Enzyms rasch ab.

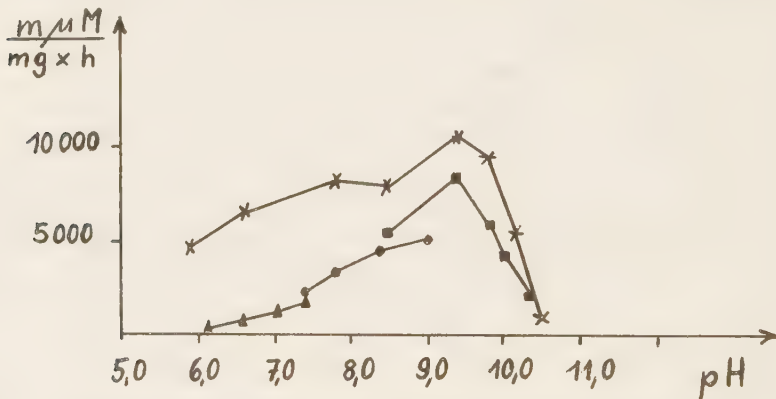


Abb.3. Abhängigkeit der enzymatischen Oxydation von Östradiol zu Östron von der H-Ionen-Konzentration. Testansatz: 0,27  $\mu$ M 17 $\beta$ -Östradiol, 0,03  $\mu$ M 17 $\beta$ -Östradiol-16C<sup>14</sup>, 1,0  $\mu$ M NAD, 0,1 - 0,2 ml (0,014 - 0,028 mg) Enzymprotein und 300  $\mu$ M Puffer, pH wie angegeben, T=25, Vol.= 3,0 ml. Folgende Puffer wurden verwendet: Imidazol/HCl ▲ — ▲, Tris/HCl ● — ●, Glycin/NaOH ■ — ■ und Kaliumphosphat x — x.

Bei gleichem pH-Wert war der Substratumsatz mit Glycin/NaOH höher als mit Tris/HCl und mit Kaliumphosphat höher als mit Glycin/NaOH (Abb.3).

Durch Zusatz von Kaliumphosphat zu Tris/HCl und Imidazol/HCl konnte die enzymatische Oxydation von Östradiol zu Östron gesteigert werden (siehe Tabelle V). Die Erhöhung der Ionenstärke allein blieb ohne Effekt.

| Puffer            | Phosphat<br>( $\mu$ M) | pH-Wert | Spezifische Aktiv.<br>( $\frac{\mu\text{mM}}{\text{h} \times \text{mg}}$ ) |
|-------------------|------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------|
| Imidazol/HCl      | -                      | 6,4     | 602                                                                        |
| Imidazol/HCl      | 25                     | 6,4     | 1065                                                                       |
| Imidazol/HCl      | 50                     | 6,4     | 1610                                                                       |
| Imidazol/HCl      | 100                    | 6,4     | 2250                                                                       |
| Imidazol/HCl      | 200                    | 6,4     | 2385                                                                       |
| Imidazol/HCl      | 300                    | 6,4     | 2625                                                                       |
| -                 | 300                    | 6,4     | 4150                                                                       |
| Tris/HCl 0,1m -   |                        | 7,4     | 1770                                                                       |
| Tris/HCl 0,2m -   |                        | 7,4     | 1990                                                                       |
| Tris/HCl 0,1m 50  |                        | 7,4     | 2880                                                                       |
| Tris/HCl 0,1m 100 |                        | 7,4     | 3860                                                                       |
| Tris/HCl 0,1m 200 |                        | 7,4     | 4580                                                                       |
| Tris/HCl 0,1m 300 |                        | 7,4     | 5480                                                                       |
| -                 | 300                    | 7,4     | 7600                                                                       |

Tabelle V. Abhängigkeit der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase von der Phosphatkonzentration. Zu üblichen Inkubationsansätzen mit Tris/HCl und Imidazol/HCl (Endkonzentration und pH wie angegeben) wurde Phosphat in steigender Konzentration zugesetzt. Inkubationsdauer 15 Min., Substrat: Östradiol-17 $\beta$ . 0,2 ml Enzym.

Das Optimum der enzymatischen Reduktion von Östron zu Östradiol lag im schwach sauren Bereich bei pH 6,2. Auch hier war bei Verwendung von Kaliumphosphatpuffer

der Substratumsatz höher als bei Verwendung von Imidazol/HCl, Tris/HCl und Natriumcitrat/NaOH (siehe Abb.4).

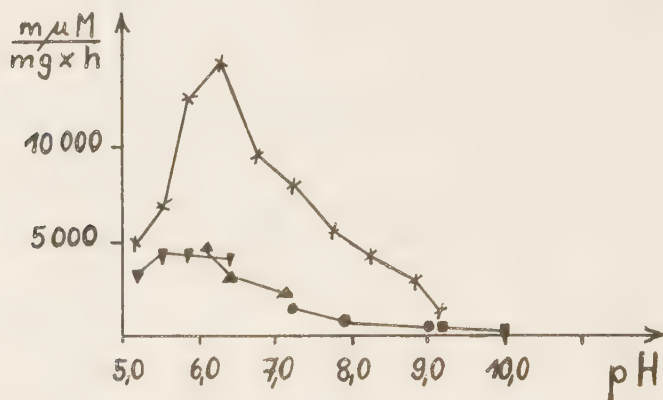


Abb. 4. Abhängigkeit der enzymatischen Reduktion von Östron von der Wasserstoffionenkonzentration.

Testansatz: 0,27  $\mu\text{M}$  Östron, 0,03  $\mu\text{M}$  Östron-4C<sup>14</sup>, 1,13  $\mu\text{M}$  NADH, 0,1 - 0,2 ml (0,014 - 0,028 mg) Enzym und 300  $\mu\text{M}$  Puffer, pH wie angegeben, T=25°C, Vol.= 3,0 ml. Folgende Puffer wurden verwendet:

Imidazol/HCl ▲ — ▲, Tris/HCl ● — ●, Glycin/NaOH ■ — ■, Kaliumphosphat x — x und Natriumcitrat/NaOH ▼ — ▼.

## ABHÄNGIGKEIT DES SUBSTRATUMSATZES VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

a) Die Abhängigkeit des Substratumsatzes von der Konzentration des Substrates Östradiol zeigt Abbildung 5 in Form der LINEWEAVER-BURK - Transformation, Abb.6 in direkter Auftragung. Bei einem pH-Wert von 9,5 wurde daraus die MICHAELIS-MENTEN -Konstante zu  $K_m = 8 \times 10^{-6} \text{ M/l}$  bestimmt (T = 25°C).

Anmerkung: Eine eventuelle Begrenzung der Reaktionsgeschwindigkeit durch begrenzte Substratlöslichkeit konnte durch Zusatz von Serumalbumin zum Inkubationsansatz ausgeschlossen werden.

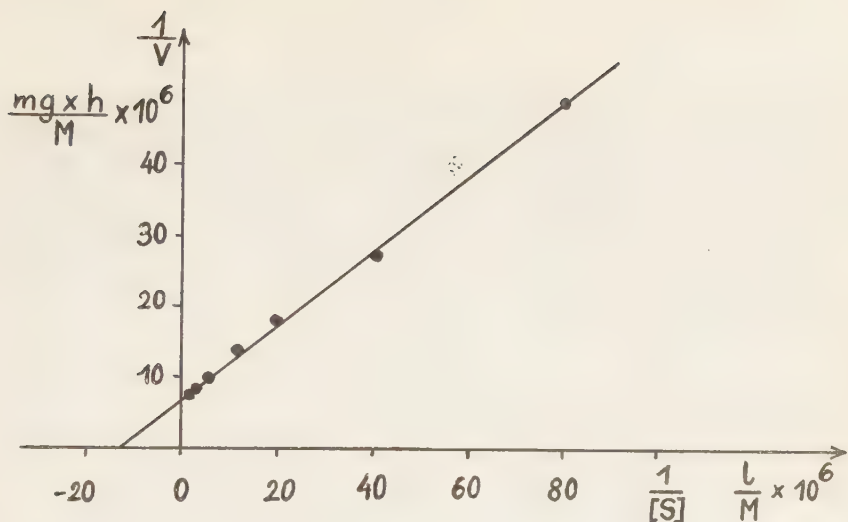


Abb.5. Oxydation von Östradiol zu Östron durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase in Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates. Verschiedene Mengen Östradiol (0,0037 - 0,3  $\mu$ M) wurden in 0,1 m Phosphat-Puffer pH 9,5 mit 1,0  $\mu$ M NAD und 0,028 mg Enzym 5 Min. inkubiert. Bestimmung des Steroidumsatzes in üblicher Weise (siehe Methodik).

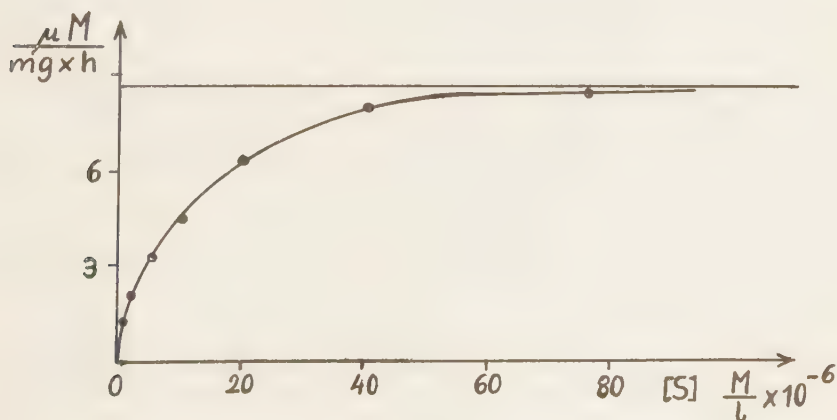


Abb.6. Abhängigkeit des Steroidumsatzes von der Substratkonzentration. Inkubation wie Abb. 5.

b) Bei der enzymatischen Reduktion von Östron zu Östradiol wurde die MICHAELIS-MENTEN-Konstante aus einer Inkubationsreihe mit steigenden Mengen Östron als Substrat errechnet. Aus der Auftragung in Form der LINE-WEAVER-BURK-Transformation (Abb.7) wurde  $K_m$  zu  $2,4 \times 10^{-4} \text{M/l}$  bestimmt;  $\text{pH} = 6,2$ ,  $T = 25^\circ \text{C}$ .

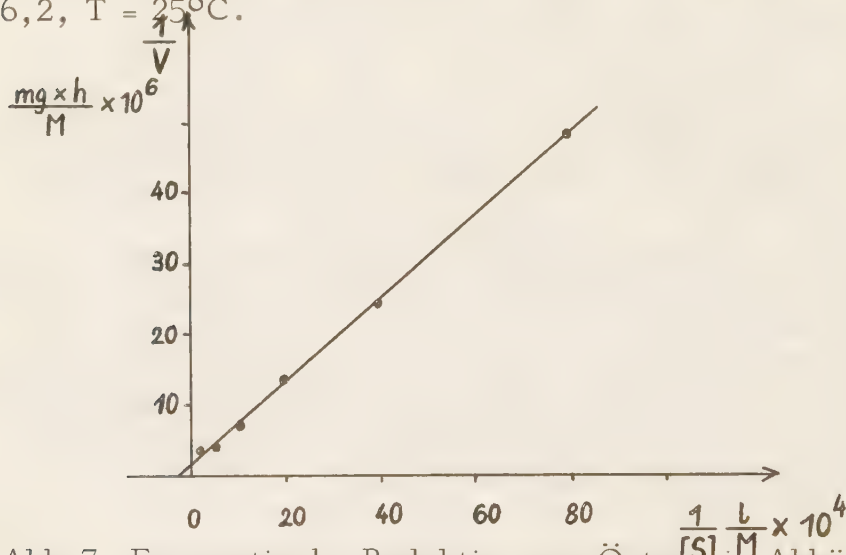


Abb.7. Enzymatische Reduktion von Östron in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.  $0,037 - 0,3 \mu\text{M}$  Östron wurden in  $0,1 \text{ m}$  Phosphatpuffer  $\text{pH } 6,2$  mit  $1,13 \mu\text{M}$  NADH und  $0,028 \text{ mg}$  Enzym  $5 \text{ Min.}$  inkubiert.  $T = 25^\circ$ ,  $\text{Vol} = 3,0 \text{ ml}$ . Bestimmung des Steroidumsatzes in üblicher Weise (siehe Methodik).

## SUBSTRATSPEZIFITÄT DER $17\beta$ -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Zur Prüfung der Substratspezifität wurde das gereinigte Enzym aus Myometrium mit Testosteron- $4\text{C}^{14}$  als Substrat und NAD als Coenzym inkubiert. Nach  $20 \text{ Min.}$  Inkubation konnte eine Oxydation von Testosteron zu Androst- $4\text{en}-3,17$ -dion nicht nachgewiesen werden (siehe Tab.VI).

| Substrat    | Inkubat.zeit<br>(Min.) | Enzym<br>(mg) | umgesetztes<br>Substrat ( $\mu$ M) |
|-------------|------------------------|---------------|------------------------------------|
| Testosteron | 0                      | 0             | 0                                  |
| Testosteron | 0                      | 0,056         | 0                                  |
| Testosteron | 20                     | 0,056         | 0                                  |
| Östradiol   | 0                      | 0,056         | 0                                  |
| Östradiol   | 20                     | 0,056         | 111,8                              |

Tabelle VI. Prüfung der Substratspezifität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Testansatz: 300  $\mu$ M Kaliumphosphat pH 9,3, 1,0  $\mu$ M NAD, 0,27  $\mu$ M Testosteron, 0,03  $\mu$ M Testosteron-4C<sup>14</sup>, 0,056mg Enzymprotein, Inkubationsdauer 20 Min. T-25°, Vol- 3,0ml Extraktion der Ansätze mit Äther/Chloroform 3 : 1, Chromatographie absteigend im System Benzol/Cyclohexan/Formamid 1 : 1. Kontrolle gegen sofort denaturierten kompletten Testansatz und Testansatz ohne Enzym.

## EINFLUSS DES COFAKTORS AUF DIE ENZYMATISCHE REAKTION

Bei der enzymatischen Oxydation von Östradiol zu Östron kann die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase neben NAD auch NADP und Azetylpyridin-NAD als Cofaktoren verwenden. Bei pH 9,5 ist sowohl in Tris/HCl- als auch in Phosphatpuffer der Substratumsatz mit NAD größer als mit NADP und Azetylpyridin-NAD. Bei Verwendung von Tris/HCl-Puffer pH 6,9 ist dagegen der Substratumsatz mit NADP höher als mit NAD, siehe Tabelle VII.

| Puffer   | pH  | Cofaktor          | umgesetztes Steroid ( $\mu\text{M}$ ) |
|----------|-----|-------------------|---------------------------------------|
| Tris/HCl | 9,5 | NAD               | 11,5                                  |
| Tris/HCl | 9,5 | NADP              | 9,4                                   |
| Phosphat | 9,5 | NAD               | 22,8                                  |
| Phosphat | 9,5 | NADP              | 18,6                                  |
| Phosphat | 9,5 | Azetylpyridin-NAD | 14,3                                  |
| Tris/HCl | 6,9 | NAD               | 11,8                                  |
| Tris/HCl | 6,9 | NADP              | 15,4                                  |

Tabelle VII. Einfluß des Cofaktors auf den Substratumsatz.  $1,0 \mu\text{M}$  NAD bzw.  $1,13 \mu\text{M}$  NADP oder  $1,9 \mu\text{M}$  Azetylpyridin-NAD,  $0,27 \mu\text{M}$   $17\beta$ -Östradiol,  $0,03 \mu\text{M}$  Östradiol- $16\text{C}^{14}$  und  $0,014 \text{ mg}$  Enzym wurden jeweils 15 Min. in  $0,1 \text{ m}$  Puffer inkubiert. Bestimmung des Steroidumsatzes in üblicher Weise.

## NACHWEIS VON SULFHYDRYLGRUPPEN

Als spezifische Sulfhydrylgruppen - Blocker dienen p-Chlormercuribenzoessäure und o-Jodosobenzoessäure. Sie wurden in  $0,1 \text{ n}$  KOH gelöst und den Inkubationsansätzen zugegeben. Wie die Ergebnisse aus Tabelle VIII zeigen, besitzt die  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus dem Myometrium funktionelle SH-Gruppen. Das Enzym wird durch  $10^{-4} \text{ m}$  p-Chlormercuribenzoessäure zu etwa 98 % und durch  $10^{-2} \text{ m}$  o-Jodosobenzoessäure zu 88% seiner ursprünglichen Aktivität gehemmt.

| p-Chlormercuri-<br>benzoesäure<br>(M/l) | o-Jodoso-<br>benz.sre.<br>(M/l) | Spez. Akt. ( $\frac{\mu\text{M Östron}}{\text{h} \times \text{mg}}$ ) | Enzymhemmung<br>% |
|-----------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------|
| -                                       | -                               | 7550                                                                  | 0                 |
| $10^{-5}$                               | -                               | 6020                                                                  | 20,0              |
| $10^{-4}$                               | -                               | 467                                                                   | 97,8              |
| $10^{-3}$                               | -                               | 0                                                                     | 100,0             |
| -                                       | $10^{-5}$                       | 6800                                                                  | 10,0              |
| -                                       | $10^{-4}$                       | 5550                                                                  | 26,5              |
| -                                       | $10^{-3}$                       | 1880                                                                  | 75,0              |
| -                                       | $10^{-2}$                       | 935                                                                   | 87,6              |

Tabelle VIII. Hemmung der Aktivität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch SH-Gruppenblocker. p-Chlormercuribenzoessäure und o-Jodosobenzoessäure (in 0,1 n KOH) wurden in der angegebenen molaren Endkonzentration folgendem Inkubationsansatz zugesetzt:

1,0  $\mu\text{M}$  NAD, 0,27  $\mu\text{M}$  17 $\beta$ -Östradiol, 0,03  $\mu\text{M}$  Östradiol-16C<sup>14</sup> und 0,1 m Phosphatpuffer, dessen pH-Wert so gewählt wurde, daß der pH im Inkubationsansatz etwa 8,8 betrug. Die Reaktion wurde mit 0,014mg Enzym gestartet.

## VERSUCHE ZUR BESTIMMUNG DER MOLEKÜLGRÖSSE DER 17 $\beta$ -HYDROXYSTEROID-DEHYDROGENASE

Aus dem Verhalten von Proteinen bei der Gelfiltration mit Dextrangelen sind Rückschlüsse auf die Molekülgröße möglich (24,25,58). Bei der Gelfiltration an

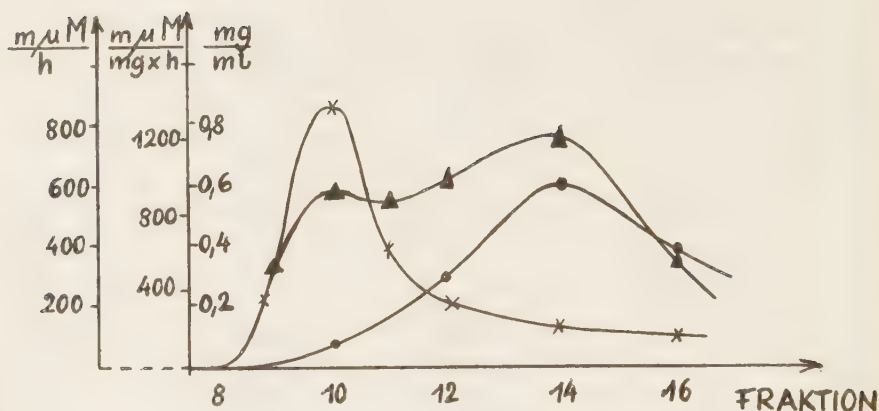


Abb. 8. Gelfiltration an Sephadex G 75. Präparation des Gels und Säulenmaße siehe Methodik. Beladen mit 5 ml Protein AS II, Proteingehalt 6,06 mg/ml, Spezifische Aktivität 42,8 mμM/h x mg. Elution mit Medium C. Auffangen von 6 ml-Fractionen. Registrierung von Proteingehalt, Gesamtaktivität und Spezifischer Aktivität der Fractionen.

Proteingehalt                    x — x  
 Gesamtaktivität                ▲ — ▲  
 Spezifische Aktivität        ● — ●

Sephadex G 50 (Fraktionierungsbereich Molekulargewicht 500 - 10 000) wurde das gesamte enzymatisch aktive Protein der 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit  $V_0$ , dem Flüssigkeitsvolumen außerhalb der Gelkörner, eluiert. Das geschieht nur mit Substanzen, deren Molekulargewicht oberhalb der Ausschlußgrenze liegt. Bei der Verwendung von Sephadex G 75 (Fraktionierungsbereich 1000 - 50 000) wurde das Enzymprotein nur unvollständig vom enzymatisch inaktiven Protein, das mit  $V_0$  eluiert wurde, abgetrennt (Abb.8).

Mit Sephadex G 100 (Fraktionierungsbereich 1000 - 100 000) dagegen ließ sich das Enzym vollständig von dem mit  $V_0$  eluierten nicht aktiven Protein abtrennen (siehe Abb. 2 Seite 12). Auf Grund dieser Versuche muß angenommen werden, daß das Molekulargewicht der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1000 bis 50 000 beträgt.

## DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß sich in der cytoplasmatischen Fraktion von Kaninchenmyometrium eine 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase befindet, die mit Östradiol bzw. Östron als Substrat und NAD oder NADP als Cofaktoren reagiert.

Das Enzym ließ sich in vier Schritten etwa 100 fach anreichern. Dadurch werden die Versuchsergebnisse von JENSEN (38) mit Rattenuteri eingeschränkt. JENSEN konnte bei parenteraler Applikation von markiertem Östradiol und auch Östron nur das jeweils verabreichte Östrogen im Rattenuterus nachweisen. Er nahm an, daß Erfolgsorgane der Östrogene ganz allgemein nicht in der Lage seien, die Oxydation oder Reduktion von Östradiol in Östron und umgekehrt durchzuführen. Für das Myometrium von Kaninchen läßt sich diese Aussage nicht bestätigen.

Die Anreicherung des Enzyms aus dem Homogenat von Kaninchenmyometrium erfolgte durch zweimalige Fällung mit Ammoniumsulfat und durch zweimalige Gelfiltration mit Sephadex G 100.

Die fraktionierte 2. Ammonsulfatfällung (Fraktionierungsgrenzen 25% Sättigung und 47% Sättigung) ergab eine Anreicherung um den Faktor 2,5 bei einer Ausbeute von 38% der eingesetzten Enzymaktivität. Es fragt sich, ob bei der relativ geringen Anreicherung der hohe Verlust an Gesamtaktivität vertretbar ist.

Der Versuch einer Reinigung des Enzyms durch Hitze-denaturisierung verlief unbefriedigend.

Die Gelfiltration mit Sephadex G 100 brachte mit jedem Schritt hohe Anreicherung (etwa Faktor 6) bei nur 4% Verlust an Gesamtaktivität. Infolge der Stabilität des

Enzyms in glycerinhaltigen Lösungen konnten diese Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Die von anderen Autoren erzielte Reinigung der  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus verschiedenem Ausgangsmaterial war meist geringer als bei dem Enzym aus Myometrium. So wurde das Enzym aus *Pseudomonas testosteroni* von DELIN und PORATH (17) 10fach, aus der Rattenniere von BREUER (8) 12fach und aus menschlicher Plazenta von LANGER und ENGEL (48) 50fach angereichert. Aus menschlicher Plazenta konnten jedoch JARABAK, ADAMS, WILLIAMS-ASHMAN und TALALAY die  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2500fach anreichern (37).

Die Schwierigkeiten bei der Reinigung des Enzyms aus Myometrium liegen vor allem in der schweren Zugänglichkeit des Ausgangsmaterials (schwängere Kaninchen am Ende der Tragzeit) und der relativ geringen Ausbeute an löslichem Protein (25 mg Protein aus 1 g Muskelgewebe).

Mit Östradiol als Substrat betrug die MICHAELIS-MENTEN - Konstante bei pH 9,5 und NAD als Cofaktor  $K_m = 8 \times 10^{-5} \text{m}$ , mit dem Substrat Östron bei pH 6,2 und NADH als Cofaktor  $K_m = 2,4 \times 10^{-4} \text{M/l}$ . Sie liegt damit in der gleichen Größenordnung wie bei anderen bisher untersuchten Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. So gaben BREUER und DAHM die MICHAELIS-MENTEN-Konstante für die  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus der Rattenniere bei pH 8,6 mit  $18,5 \times 10^{-5} \text{M/L}$ , aus der Rattennebnieren bei pH 8,8 mit  $2,3 \times 10^{-4} \text{M/l}$  an.

Während die meisten Autoren  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen beschrieben, die mit Testosteron als Substrat reagieren (8,14,29,45), wurde mit der  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus dem Myometrium praktisch keine Umwandlung von Testosteron zu Androst-4en-3,17-dion gefunden.

Der Nachweis von Sulfhydrylgruppen gelang bei der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Myometrium durch Hemmung der Aktivität des Enzyms mit p-Chlormercuribenzoessäure in einer Konzentration von  $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  und o-Jodosobenzoessäure in Konzentrationen von  $10^{-2}$  -  $10^{-5}$  m. Mit  $10^{-4}$  m p-Chlormercuribenzoessäure wurde eine Hemmung von etwa 98%, mit  $10^{-3}$  m o-Jodosobenzoessäure eine Hemmung von 75% der ursprünglichen Aktivität des Enzyms erreicht. BREUER, DAHM, TALALAY et al. kommen zu ähnlichen Ergebnissen und geben die gleichen Hemmkonzentrationen für die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase an (8,14,53,69). STEMPFEL und Mitarbeiter fanden bei den 3,17-Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas testosteroni* eine Hemmung der  $\beta$ -Aktivität mit p-Hydroxymercuribenzoat nur bis zu maximal 40% der Ausgangsaktivität.

Das pH-Optimum der enzymatischen Oxydation lag bei einem pH-Wert von 9,4 während die Reduktion bei etwa pH 6,2 mit größter Geschwindigkeit erfolgte. BREUER gibt für die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus der Rattenniere (8) für die Oxydation ein pH-Optimum von 8,7, für die Reduktion von pH 6,6 an. Auch die Angaben aus dem Arbeitskreis von KOCHAKIAN (3) über einen optimalen pH-Wert von 9,6 für die  $\Delta^5,3\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen überein.

Neben der Wasserstoffionenkonzentration beeinflusste auch der verwendete Puffer allein die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion. Bei der Verwendung von 0,1 m Phosphat war der Steroidumsatz 1,5 - 3 mal so hoch wie mit den anderen Puffern (Tris/HCl, Glycin/NaOH, Imidazol/HCl, Natriumcitrat/NaOH). Durch diese Beobachtung werden die Angaben von PORTIUS und REPKE bestätigt. Sie fanden ebenfalls eine beschleunigte Steroidumsetzung durch die Östradiol-Dehydrogenase aus Erythrozyten bei Inkubation in

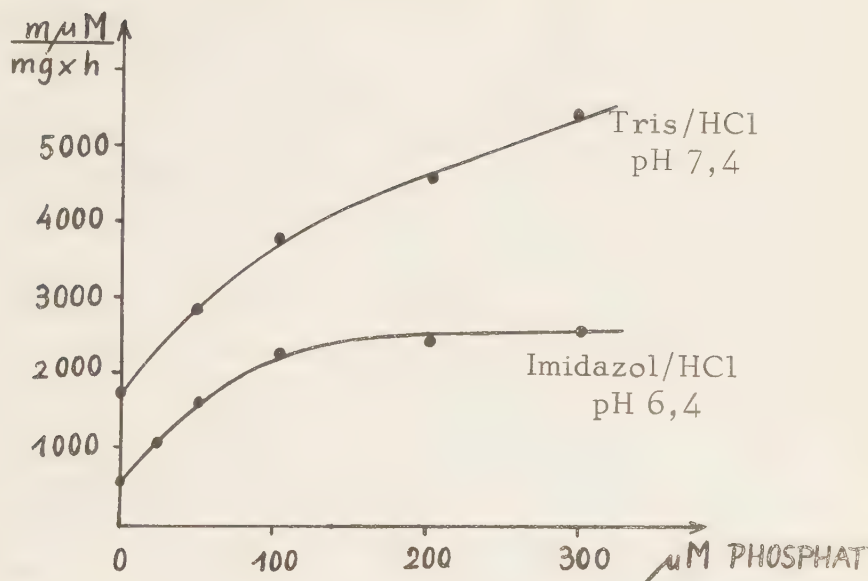


Abb.9 Abhängigkeit der 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase von der Phosphatkonzentration. Versuchsanordnung siehe Tabelle V, Seite 15.

Phosphatpuffer (60). Durch Zusatz von anorganischem Phosphat zu anderen Puffern (Tris/HCl, Imidazol/HCl, siehe Tabelle V, Seite 15, Abb.9, Seite 27) konnte der Substratumsatz in Abhängigkeit von der Konzentration an Phosphat gesteigert werden.

Besonders stark war der Einfluß von Phosphat bei der enzymatischen Reduktion von Östron zu Östradiol; hier war der Steroidumsatz mit Tris/HCl-, Imidazol/HCl-, Glycin/NaOH- und Natriumcitrat/NaOH-Puffer nur etwa halb so groß wie bei der Oxydation von Östradiol. Mit Phosphatpuffer dagegen überstieg der Steroidumsatz bei der Reduktion den Wert bei der Oxydation.

Als Ursache für diese Befunde ließe sich eine Hemmung des Enzyms durch Tris/HCl-, Imidazol/HCl-, Glycin/NaOH-Natriumcitrat/NaOH-Puffer diskutieren. Hiergegen ist jedoch einzuwenden, daß eine Erhöhung der Pufferkonzentration auf das doppelte den Steroidumsatz nicht beeinflusste. Andererseits könnte Phosphat eine Aktivierung des Enzyms hervorrufen. Dafür würde die Proportionalität zwischen zugesetzter Kaliumphosphatmenge und Steroidumsatz sprechen (siehe Abb.9).

Das Verhalten der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Myometrium bei der Gelfiltration erlaubt Rückschlüsse auf die Größe des Enzymmoleküls. Wie aus den Arbeiten von PORATH u.a. (24,25,58) hervorgeht, werden Stoffe infolge des "Molekülsiebeffektes" der Dextrangele in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße eluiert, wobei eine Fraktionierung nur dann erfolgen kann, wenn die Größe des oder der Moleküle unterhalb der für jedes verwendete Gel charakteristischen Ausschlußgröße liegt.

Bei der Filtration mit Sephadex G 50 (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 10 000) wurde das enzymatisch aktive Protein nicht von der Hauptmenge des mit  $V_0$  eluierten Proteins abgetrennt. Mit Sephadex G 75 (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 50 000) erfolgte die Trennung von aktivem und inaktivem Protein nur teilweise, während bei der Verwendung von Sephadex G 100 (Ausschlußgrenze Molekulargewicht 100 000) eine vollständige Trennung des Enzymproteins vom inaktiven Protein möglich war.

Auf Grund dieser Versuche kann angenommen werden, daß das Molekulargewicht der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus dem Myometrium von Kaninchen etwa 10 000 bis 50 000 beträgt.

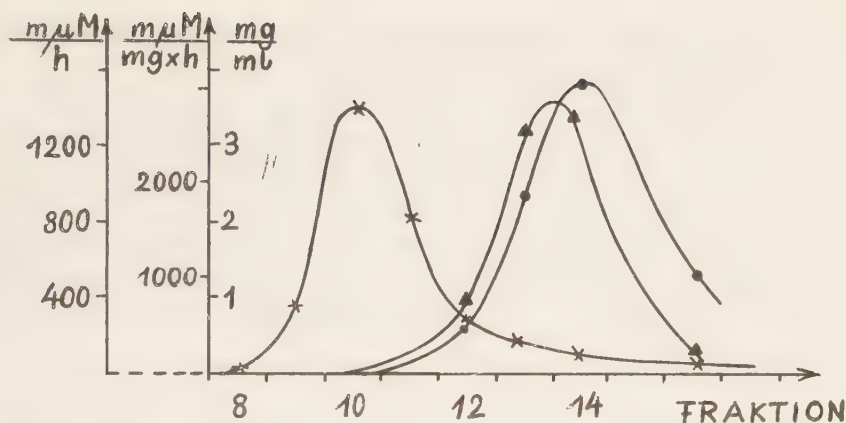


Abb.10. Sephadex G 100-Gelfiltration mit plazentarem Enzym nach der 2. Ammoniumsulfatfällung. 5 ml Protein (9,3 mg/ml, 160  $\frac{m\mu M}{mg \times h}$ ) wurden aufgegeben, mit Medium C eluiert und wie oben 6 ml-Fractionen aufgefangen.

Proteingehalt x — x; Gesamtakt. ▲ — ▲ ; Spez. Akt. ● — ●

Um die Molekülgrößen der 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen aus Myometrium und aus menschlicher Plazenta miteinander vergleichen zu können, wurde das Enzym aus menschlicher Plazenta dem gleichen Reinigungsverfahren unterworfen wie die Dehydrogenase aus Myometrium (Homogenat, 2 x Ammoniumsulfatfällung, Gelfiltration).

Bei der Gelfiltration mit Sephadex G 100 fand sich kein Unterschied zwischen den beiden Enzymen. Beide Enzyme zeigten bei Einhaltung der gleichen technischen Bedingungen (Säulenquerschnitt, Füllhöhe, Durchflußgeschwindigkeit, Volumen der aufgefundenen Fraktionen) ein identisches Fraktionierungsschema (vergleiche Abb.2, Seite 12 und Abb.10, Seite 29). Man darf daher annehmen, daß

die Molekülgrößen des Enzyms aus Plazenta und Myometrium etwa übereinstimmen.

In diesem Zusammenhang sind Versuche von DELIN und PORATH (17) zu erwähnen, die bei der Gelfiltration von Extrakten aus *Pseudomonas testosteroni* ein ähnliches Elutionschema für die  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus Mikroorganismen fanden wie für das Enzym aus Warmblüterorganen, über das hier berichtet wurde.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die cytoplasmatische Fraktion von Kaninchenmyometri-um enthält ein 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die mit Östradiol als Substrat und NAD, NADP und Azetylpyridin-NAD als Cofaktoren reagiert. Die Molekülgrösse beträgt 10 000 bis 50 000.

Das Enzym wurde nach zweimaliger Ammoniumsulfatfällung und zweimaliger Gelfiltration mit Sephadex G 100 etwa 100 fach angereichert.

Das Optimum für die enzymatische Oxydation von Östradiol zu Östron liegt bei pH 9,4, das pH-Optimum für die Reduktion von Östron zu Östradiol bei pH 6,2.

Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante beträgt mit Östradiol als Substrat bei pH 9,5 und  $T = 25^{\circ}\text{C}$   $8 \times 10^{-6} \text{ M/l}$ , mit Östron als Substrat  $2,4 \times 10^{-4} \text{ M/l}$  bei pH 6,2 und  $T=25^{\circ}$ .

Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase besitzt funktionelle Sulfhydrylgruppen.

Die Aktivität des Enzyms wird durch Zusatz von anorganischem Phosphat gesteigert.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bickenbach für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes in seiner Klinik danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jütting für die fachliche Beratung und Förderung der Arbeit sowie Fräulein Enderle für technische Ratschläge.

## LITERATUR

- 1 ABE, T., D.D. HAGERMAN, and C. VILLEE:  
Eströgen Dependent Pyridine Nucleotide Transhydro-  
genase of Human Myometrium. J. Biol. Chem. 239  
(1964) 414.
- 2 ADAMS, J.A., J. JARABAK, and P. TALALAY:  
The Steroid Specificity of the  $17\beta$ -Hydroxysteroid  
Dehydrogenase of Human Placenta. J. Biol. Chem.  
237 (1962) 3069.
- 3 AOSHIMA, Y., C.D. KOCHAKIAN, and JADRIJEVIC:  
TPN- and DPN-Specific  $3\alpha$ -Hydroxy- and  $\Delta^5$ - $3\beta$ -Hy-  
droxysteroid Dehydrogenases of Liver and Kidney.  
Endocrinology 74 (1964) 521.
- 4 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER,  
R. CZOK, K.H. GARBADE, E. MEYER - ARENDT,  
G. PFLEIDERER:  
Diphospho-Fruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-  
Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycero-  
phosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Ka-  
ninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.  
Z. Naturforsch. 8b (1953) 555.
- 5 BERGMAYER, H.U.: Methoden der enzymatischen  
Analyse, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, 1962.
- 6 BETTENDORF, G.: Diskussionsbemerkung in 40.
- 7 BISCHOFF, F., R.E. KATHERMAN, and Y.S. Yee:  
Activation of Estrone by Mammalian Red Cells.  
Am. J. Physiol. 164 (1951) 774.
- 8 BREUER, H., K. DAHM: Anreicherung und Charak-  
terisierung einer  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Oxydoreduk-  
tase der Rattenniere. Bioch. Biophys. Acta 85 (1964)  
29.

- 9 BREUER, H., R. OZON, C. MITTERMAYER:  
Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. I. Vorkommen von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen bei Fischen und Amphibien. Hoppe-Seyler's Z.f.phys.Chem. 333 (1963) 272.
- 10 BREUER, H., R. OZON, C. MITTERMAYER:  
Untersuchungen über den Stoffwechsel von Steroidhormonen bei Vertebraten. II. Hydroxylierung von Östradiol-17 $\beta$  zu 6-Hydroxyöstradiol-17 $\beta$  und Östriol in der Leber von Amphibien. Hoppe-Seyler's Z.f.phys.Ch. 333(1963) 282.
- 11 BREUER, H., K. DAHM:  
Aktivität von Steroenzymen in dem durch 7,12-Dimethylbenzanthrazen induzierten Mammacarcinom der Ratte. Naturw. 53 (1966) 203.
- 12 BURTON, A. F.:  
Inhibition of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Rat and Mouse Tissues in Vitro and in Vivo. Endocr. 77 (1965) 325.
- 13 COLOWICK, S. P., N. O. KAPLAN, E. F. NEUFELD, and M. M. CIOTTI:  
Pyridine Nucleotide Transhydrogenase. I. Indirect Evidence for the Reaction and Purification of the Enzyme. J. Biol. Chem. 195 (1952) 95.
- 14 DAHM, K., H. BREUER:  
Anreicherung einer 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus der Nebenniere der Ratte. Hoppe-Seyler's Z. f. phys. Chem. 336 (1964) 63.
- 15 DAVENPORT, G. R., and L. E. MALLETT:  
Some Biochemical Properties of Rabbit Ovarian Hydroxysteroid Dehydrogenases. Endocrin. 78(1966)672.

- 16 DAVIES, J., G.R. DAVENPORT, J.L. NORRIS,  
and P.I.C. RENNIC:  
Histochemical Studies of Hydroxysteroid Dehydro-  
genase Activity in Mammalian Reproductive Tissues.  
Endocrin. 78 (1966) 667.
- 17 DELIN, S., and J. PORATH: Purification of  $\Delta$ - and  
 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases from *Pseudomo-  
nas Testosteroni* by Gel Filtration.  
Bioch. Biophys. Acta 67 (1963) 197.
- 18 DÖLLEFELD, E., H. BREUER: Nachweis von Östra-  
diol: NAD<sup>+</sup>- 17 $\Delta$ - und 17 $\beta$ -Oxidoreduktasen in der  
Cytoplasma-Fraktion der Pferde - Plazenta. Bioch.  
Biophys. Acta 124 (1966) 187.
- 19 DOUNCE, A.L.: In "Nucleic Acids" (E. Chergeffand,  
J.N. Davidson, eds.) Vol. II, S. 93, Academic Press,  
New York (1955).
- 20 ENDAHL, G.L., C.D. KOCHAKIAN, and D. HAMM:  
Separation of a TPN-Specific Testosterone Dehydro-  
genase from DPN-Specific Dehydrogenase of Guinea  
Pig Liver. J. Biol. Chem. 235 (1960) 2792.
- 21 ENDAHL, G.L., and C.D. KOCHAKIAN: Partial  
Purification and Further Characterization of the  
TPN-Specific C<sub>19</sub>-17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydro-  
genase of Guinea Pig Liver. Bioch. Biophys. Acta  
62 (1962) 245.
- 22 FERRARI, R.A., and A. ARNOLD: Inhibition of  $\beta$ -  
Hydroxysteroid Dehydrogenases. I. Structural  
Characteristics of some Steroidal Inhibitors.  
Bioch. Biophys. Acta 77 (1963) 349.
- 23 FERRARI, R.A., and A. ARNOLD: Inhibition of  $\beta$ -  
Hydroxysteroid Dehydrogenases. II. Kinetics and  
pH Effect. Bioch. Biophys. Acta 77 (1963) 357.

- 24 FORCHIELLI, E., and R.J. DORFMAN: Separation of  $\Delta 4-5\alpha$ - and  $\Delta 4-5\beta$ -Hydrogenases from Rat Liver Homogenates. *J. Biol. Chem.* 223 (1956) 443.
- 25 GELOTTE, B.: Studies on Gel Filtration: Sorption Properties of the Bed Material Sephadex. *J. Chromatogr.* 3 (1960) 330.
- 26 GOLDBERG, B., G.E.S. JONES, and D.A. TURNER: Steroid  $3\beta$ -ol Dehydrogenase Activity in Human Endocrine Tissues. *Am. J. Obst. Gynec.* 86(1963)349.
- 27 GOLDBERG, B., G.E.S. JONES, and H.I. BORKOWF: A Histochemical Study of Substrate Specificity for the Steroid  $3\beta$ -ol Dehydrogenase and Isomerase Systems in Human Ovary and Testis. *J. Histochem. Cytochem.* 12 (1964) 880.
- 28 GOLDMANN, A.S., A.M. BONGIOVANNI, W.C. YAKOVAC, and A. PRADER: Study of  $\Delta 5,3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase in Normal Hyperplastic and Neoplastic Adrenal Cortical Tissues. *J. clin. Endocr. Metab.* 24 (1964) 894.
- 29 HAGERMANN, D.D., and C. VILLEE: Effect of Estradiol on the Metabolism of Human Endometrium in Vitro. *J. Biol. Chem.* 203 (1953) 425.
- 30 HOLLANDER, V.P., H. JONAS, and D.E. SMITH: Estradiol-Sensitive Isocitric Dehydrogenase in Noncancerous and Cancerous Human Breast Tissues. *Cancer* 11 (1958) 803.
- 31 HOLLANDER, V.P., N. HOLLANDER, and J.D. BROWN: Inhibition of Steroid Mediated Pyridine Nucleotide Transhydrogenase and  $17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase by 2-Adenylic Acid. *Proc. Soc. Exptl. Biol.* 101 (1959) 475.

- 32 HÜBENER, H.J., D. FUKUSHIMA, and T.F. CALLAGHER: Substrate Specificity of Enzymes Reducing the 11- and 20-Keto Groups of Steroids. *J. Biol. Chem.* 220 (1956) 499.
- 33 HÜBENER, H.J., F.G. SAHRHOLZ: 20 $\beta$ -Hydroxysteroid-dehydrogenase. II. Darstellung und Kristallisation. *Bioch. Z.* 333 (1960) 95.
- 34 HURLOCK, B., P. TALALAY: Principles of the Enzymatic Measurement of Steroids. *J. Biol. Chem.* 227 (1957) 37.
- 35 HURLOCK, B., P. TALALAY: 3 $\alpha$ -Hydroxysteroids as Coenzymes of Hydrogen Transfer between Di- and Triphosphopyridine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 886.
- 36 HURLOCK, B., P. TALALAY: Microsomal 3 $\alpha$ - and 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Arch. Bioch.* 80 (1959) 468.
- 37 JARABAK, J., J.A. ADAMS, H.G. WILLIAMS-ASHMAN, and P. TALALAY: Purification of a 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase of Human Placenta and Studies on its Transhydrogenase Function. *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 345.
- 38 JENSEN, E.V.: Über die Wirkungsweise von Östrogenen. *Dtsche. Med. Wochschr.* 88 (1963) 1229.
- 39 JÜTTING, G.: Die Östradiol-17 $\beta$ -Dehydrogenase des Myometriums. *Z. Gebh. Frauenh.* 22 (1962) 973.
- 40 JÜTTING, G.: Die Wirkung von Östrogenen auf die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid:NAD-oxydoreduktase des Myometriums von Kaninchen. *Z. Gebh. Frauenh.* 26 (1966) 636.
- 41 KALCKAR, H.M.: Differential Spectrophotometry of Purine Compounds by means of Specific Enzymes. III. Studies of the Enzymes of Purine Metabolism. *J. Biol. Chem.* 167 (1947) 461.

- 42 KINSON, G. A., and C. D. KOCHAKIAN: DPN- and TPN-C<sub>19</sub>-Steroid Dehydrogenases and Reductases in Accessory Sex Tissues. *Am. J. Physiol.* 206 (1964) 443.
- 43 KOCHAKIAN, C. D., B. R. CARROL, and B. UHRI: Comparisons of the Oxidation of C<sub>19</sub>-Hydroxysteroids by Guinea Pig Liver Homogenates. *J. Biol. Chem.* 224 (1957) 811.
- 44 KOCHAKIAN, C. D., J. HILL, and S. AONUMA: Regulation of Protein Biosynthesis in Mouse Kidney by Androgens. *Endocrinology* 72 (1963) 354.
- 45 KOIDE, S., C. CHEN and S. FREEMAN: Inhibition of 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Mediated Transhydrogenases of Rat Liver Homogenate by 4 $\alpha$ -3 oxo Steroids. *Bioch. Biophys. Acta* 38 (1960) 374.
- 46 KOIDE, S.: Purification of 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Obtained from the Soluble Fraction of Rat Liver. *Arch. Bioch. Biophys.* 101 (1963) 278.
- 47 LANGER, L. J., and L. L. ENGEL: Human Placental Estradiol-17 $\beta$ -Dehydrogenase. *Fed. Proc.* 15 (1956) 296.
- 48 LANGER, L. J., and L. L. ENGEL: Human Placental Estradiol-17 $\beta$ -Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 583.
- 49 LEVY, H. R., and P. TALALAY: Bacterial Oxidation of Steroids. II. Studies on the Enzymatic Mechanism of Ring A Dehydrogenation. *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 2014.
- 50 MARKUS, P. J., and P. TALALAY: On the Molecular Specificity of Steroid Enzyme Combinations: The Kinetics of  $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Proc. Roy. Soc. London* 144 (1955) 116.

- 51 MARKUS, P. J., and P. TALALAY: Induction and Purification of  $\Delta$ - and  $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases. J. Biol. Chem. 218 (1956) 661.
- 52 MEYER, A. S.: Conversion of 19-Hydroxy $\Delta$ 4-androstene-3,17-dione to Estrone by Endocrine Tissue. Bioch. Biophys. Acta 17 (1955) 441.
- 53 MITTERMAYER, C., H. BREUER, W. DIRSCHERL: Enzymatische Dehydrierung von Equilin zu Equilenin. Endocrin. 43 (1963) 195.
- 54 MITTERMAYER, C., H. BREUER: Charakterisierung und Kinetik der Equilin-Dehydrogenase. Bioch. Biophys. Acta 77 (1963) 191.
- 55 MONDER, C., and A. WRIGHT: Proc. Intern Congr. Biochem. 5th, Moskau (1961), p.262.
- 56 NESEMANN, G., H. J. HÜBENER, R. JUNK, J. SCHMIDT-THOME: 20 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen. I. Züchtung von Streptomyces hydrogenans und Induktion des Enzyms. Bioch. Z. 333 (1960) 88.
- 57 NESEMANN, G., H. J. HÜBENER, R. JUNK, J. SCHMIDT-THOME: 20 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenasen. II. Darstellung und Kristallisation. Bioch. Z. 333 (1960) 95.
- 58 PORATH, J., and P. FLODIN: Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. Nature 183 (1959) 1657.
- 59 PORATH, J.: Some Recent Developments in Preparative Electrophoresis and Gel Filtration. Metabolism 13 (1964) 1004.
- 60 PORTIUS, H. J., K. REPKE: Eine Östradiol-17 $\beta$  Dehydrogenase in den Erythrozyten der Ratte. Arch. Exptl. Path. Pharm. 239 (1960) 144.
- 61 REPKE, K.: Die Kinetik der Umsetzung von Östron

- und Östradiol-17 $\beta$  durch Hefe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 230 (1957) 178.
- 62 RUBIN, B.L., G.LEIPSNER, and H.W.DEANE: A Rapid Sensitive Assay Procedure for Adrenal Steroid-3 $\beta$ -ol-Dehydrogenase Activity. Endocr. 69 (1961) 619.
- 63 SAMUELS, L.T., M.L.HELMREICH, M.B.LASATER, and M. REICH: An Enzyme in Endocrine Tissues which Oxidizes  $\Delta^5$ -3 Hydroxysteroids to  $\Delta^4$ ,  $\beta$  Unsaturated Ketones. Science 113(1951)490.
- 64 SCHMIDT-THOME, J., G.NESEMANN, H.J. HÜBENER, J. ALESTER: 20 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. III. Substratspezifität der Oxydoreduktion und Induktion. Bioch.Z. 336 (1962) 321.
- 65 SCHNEIDER, J.J.: Enzymatic Reduction of Compound E-21-Aldehyde to Compound E. J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 2024.
- 66 SQUIRE, P.G., S.DELIN, and J. PORATH: Physical and Chemical Characterization of Hydroxysteroid Dehydrogenases from *Pseudomonas testosteroni*. Bioch. Biophys. Acta 89 (1964) 409.
- 67 STEMPFEL, R.S., and J. SIDBURY: Studies with the Hydroxysteroid Dehydrogenases: I. A Simplified Method for the Enzymatic Estimation of 3- and 17-Hydroxysteroids. J. clin. Endocr. Metab. 24 (1964) 4.
- 68 TALALAY, P., M.M.DOBSON, and D.F.TAPLEY: Oxidative Degradation of Testosterone by Adaptive Enzymes. Nature (London) 170 (1952) 620.
- 69 TALALAY, P., and P.J. Markus: Enzymatic Formation of 3 $\alpha$ -Hydroxysteroids. Nature (London) 173 (1954) 1189.

- 70 TALALAY, P., and P.J. MARKUS: Specificity, Kinetics, and Inhibition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases. *J.Biol.Chem.* 218(1956) 675.
- 71 TALALAY, P.: Enzymatic Mechanismus in Steroid Metabolism. *Physiol. Revue* 37 (1957) 362.
- 72 TALALAY, P. and H.G. WILLIAMS-ASHMAN: Activation of Hydrogen Transfer between Pyridine Nucleotides by Steroid Hormones. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 44 (1958) 15.
- 73 TROOP, R.C.: Sex Difference in Metabolism of Cortisone by Rat Liver Homogenates. *Fed. Proc.* 17 (1958) 415.
- 74 TROOP, R.C.: Influence of Gonadal Hormones on the Metabolism of Cortisone. *Endocr.* 64(1959) 671.
- 75 UNGAR, F., and R.J. DORFMAN: The Conversion of  $17\alpha$ -21-Dihydroxypregnane-3,20-dione to  $3\alpha$ ,  $17\alpha$ , 21-Trihydroxypregnane-20-one in Vitro. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 1197.
- 76 UNGAR, F., M. GUT, and R.J. DORFMAN: Metabolism of  $\Delta^4$ -Androstene- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -diol in Vitro. *J. Biol. Chem.* 224 (1957) 191.
- 77 VILLEE, C., and D.D. HAGERMAN: On the Identity of the Estrogen-Sensitive Enzyme of Human Placenta. *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 42.
- 78 VILLEE, C., D.D. HAGERMAN, P.B. JOEL: An Enzymatic Basis for the Physiologic Functions of Estrogens. *Recent Progr. Horm. Res.* 16 (1960) 49.
- 79 VILLEE, C., J.M. SPENCER: Some Properties of the Pyridine Nucleotide-Specific  $17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases of Guinea Pig Liver. *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 3615.

- 80 VILLEE, C., and L. ENGEL: Mechanism of Action of Steroid Hormones, (1961) Pergamon Press, New York.
- 81 VILLEE, C.: Die Beeinflussung von Enzymen im Uterus und Plazenta durch Östrogene. Klin. Wschr. 39 (1961) 173.

## LEBENS LAUF

Am 19.8.1942 wurde ich, Klaus-Jürgen Otto Thun, als einziges Kind des Gymnasialprofessors Fritz Thun und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Hoffmann, in Goldberg/Schlesien geboren.

Nach der Vertreibung 1945 erreichten wir den oberfränkischen Raum, wo ich erst in Haig (Landkreis Kronach), später in Coburg die Volksschule besuchte. Im Jahre 1952 trat ich in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium "Ernestinum" ein und legte 1961 das Abitur ab.

Das Studium der Medizin begann ich an der Universität Erlangen, an der ich im Jahre 1962 die naturwissenschaftliche, 1964 die ärztliche Vorprüfung bestand. Das 6. und 7. Semester studierte ich in Freiburg. Im Dezember 1964 heiratete ich und zog mit meiner Frau Bärbel, geb. Dietze, nach München. Dort schloß ich das Medizinstudium im Sommer 1967 durch das Staatsexamen ab.





